

THESIS

TÜBINGEN

1967

Histochemische Untersuchungen an der Rattenleber nach Verabfolgung von Nitrosaminen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Georgia Papadopulu
aus Athen

9049

1967

LANE MEDICAL LIBRARY OF
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR
-ALTO, CALIFORNIA



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153517_0036

Histochemische Untersuchungen an der Rattenleber nach Verabfolgung von Nitrosaminen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Georgia Papadopulu
aus Athen

1967

Histochenische Untersuchungen an der
Rattenleber nach Verabfolgung von
Mitarbeiterinnen

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
des Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Köln

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Februar 1967

Dekan:

Professor Dr. H. Auterhoff

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Friedrich - Freksa

2. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. G. Weitzel

Georgs Verlag
am Alten

Ein besonderes Anliegen ist es mir, auch an dieser Stelle meinem Lehrer, Herrn Professor Dr. Hans Friedrich-Frekssa, für die Anregung der vorliegenden Arbeit und für seine Beratung, Unterstützung und gütige Förderung herzlich zu danken.

Einleitung

Mit zahlreichen organischen Verbindungen aus verschiedenen Stoffgruppen (Azofarbstoffe, Fluorene, Nitrosamine), lassen sich an der Rattenleber Carcinome erzeugen. Während die Azofarbstoffe schon in den 20iger Jahren durch japanische Forscher angewandt wurden (YOSHIDA, KINOSITA)(1), sind die Nitrosamine erst in den letzten Jahren in den Vordergrund getreten (BARNES u. MAGEE)(2). Für die experimentelle Tumorforschung sind die Nitrosamine aus verschiedenen Gründen besonders geeignet. (18) (19) (21)

1. Die Nitrosamine sind wasserlösliche Stoffe, die zum grössten Teil durch den Körper wieder rasch ausgeschieden werden. Die Dosierung ist bei ihnen zuverlässiger als bei den z.T. im Fettgewebe abgelagerten Azofarbstoffen und Fluorenen.
2. Bei entsprechender Dosierung können bei allen Ratten Lebercarcinome erzeugt werden. Bei den Azofarbstoffen hängt indessen die Carcinomerzeugung auch von dem Vitaminreichtum des zusätzlich gegebenen Futters ab.
3. Bei Verabfolgung von Nitrosaminen erhält man fast ausschliesslich Carcinome der Leberparenchymzellen, während sich bei den Azofarbstoffen auch Carcinome der Gallengänge ausbilden.

Die Versuche von DRUCKREY u. Mitarb. (3, 22) zeigen, dass eine Dosis von etwa 140 mg/kg Ratte zur Tumorerzeugung bei fast allen Tieren nötig ist. Die zur Tumorerzeugung notwendige Dosis bleibt annähernd gleich, ob sie auf wenige Wochen oder auf mehrere Monate verteilt wird. Im letzteren Fall treten die Tumoren später auf. Im allgemeinen dauert es mehrere Monate bis Tumoren entstanden sind.

Die vorliegende Arbeit schliesst in ihrer Fragestellung an eine Mitteilung von GÖSSNER u. FRIEDRICH-FREKSA (1964)(13) an; GÖSSNER und FRIEDRICH-FREKSA untersuchten mit histochemischen Mitteln die Aktivität der Glucose-6-phosphatase in der Rattenleber nach Verabfolgung von Diäthylnitrosamin (DAENA). Während in der normalen Leber jede Parenchymzelle Glucose-6-phosphatase-aktiv ist (wenigstens wenn nicht frisch gefüttert wurde) treten einige Wochen nach Verabfolgung von DAENA scharf umschriebene Bezirke auf, die Glucose-6-phosphatase-frei sind (vgl. Abb. 3). Erst 4-5 Monate später treten Carcinome auf. WEBER u. CANTARO (1955) (4) haben bereits festgestellt, dass im experimentell erzeugten Lebercarcinom gewöhnlich die Glucose-6-phosphatase fehlt. So war es wahrscheinlich, dass aus diesen Bezirken später Carcinome entstehen.

Das Auftreten dieser Glucose-6-phosphatase-freien Inseln erinnert sehr an Beobachtungen von E-WEILER (1956), bei denen mit serologischen Methoden nach Verfütterung von Azofarbstoffen eine Verringerung des sog. gewebsspezifischen Antigens in inselartigen Bezirken der Rattenleber (vgl. FRIEDRICH-FREKSA, SÜSS u. BÖRNER)(5) festgestellt wurde. Das sog. gewebsspezifische Antigen fehlt ebenso wie die Glucose-6-phosphatase häufig in den Lebercarcinomen.

Es war zu fragen, ob nicht ein für die Leber toxisches, aber nicht cancerogenes Agens ähnliche Veränderungen hervorbringen kann, wie die Nitrosamine. Es war zu untersuchen, ob der Verlust der Aktivität der Glucose-6-phosphatase in den Inseln und in den Tumoren immer gleichmässig erfolgt oder nicht. Ferner war es wünschenswert, weitere histochemische Reaktionen mit Einschluss des serologischen Nachweises des gewebsspezifischen Antigens durch fluoreszierende Antikörper durchzuführen.

Eine offene Frage war auch, ob die Inseln sich nach geringen Dosen von Nitrosamin, die zur Tumorerzeugung im allgemeinen nicht ausreichen, bilden können und ob sie dann irreversibel sind oder sich wieder zurückbilden.

Auch das Wachstum der Inseln bedurfte einer näheren Untersuchung: Vergrössern sich die Inseln gleichmässig, bis Carcinome entstehen, gar nicht, oder sprunghaft?

Material und Methodik

Die Versuchsratten wurden zu 2-5 in einem Käfig gehalten. Bei Beginn der Versuche wurde das cancerogene Agens im Trinkwasser gegeben. Der Verdünnungsgrad des cancerogens wurde so eingeteilt, dass die täglich verbrauchte Wassermenge die erwünschte Dosierung bei den Versuchstieren ergab.

Um grössere Genauigkeit zu erzielen, wurden die späteren Versuche nur mit der Magensonde durchgeführt. Die tägliche Cancerogendosis wurde den Ratten mit der Magensonde am späten Nachmittag gegeben (das Mittel in 0,5 ml Leitungswasser gelöst).

Die Versuchstiere wurden zur Obduktion mit Leuchtgas narkotisiert. Die noch lebenden Tiere entbluteten in die Brusthöhle, nachdem die grossen Herzgefässe geöffnet worden waren. Von den Ratten wurden die Leberlappen herausgeschnitten; gelegentlich zur Kontrolle wurde auch ein Stück Niere herausgeschnitten und mitaufgearbeitet.

Von jedem der 4 Leberlappen wurde ein Gewebstückchen entnommen und auf ein Kryostatstückchen zusammengelegt. Nach dem Einfrieren mit CO_2 und anschliessend Schneiden entsteht ein Kombinations-Präparat der 4 Proben. Zusätzlich wurde ein Kombinations-Präparat von den grossen Leberlappen von 3

Tieren gemacht, welche zu dem gleichen Zeitpunkt getötet wurden. Wenn nicht besonders angegeben wurden die Tiere mehrere Stunden nach der letzten Fütterung getötet.

Die unfixierten, eingefrorenen Gewebestücke wurden in Kryostat nach Dittes-Duspiva in einer Schnittdicke von 10 μ geschnitten. Die auf dem Objektträger aufgenommenen Schnitte wurden je nach Verwendungszweck in den entsprechenden Lösungen fixiert. Für Hämalaun, Kresyl-Violet und Fettfärbung, sowie für den Enzymnachweis von saueren, alkalischen, ATP Phosphatase und Gl-6-Phosphatase wurde die Lösung von 4% Formalin-Makrodex^(R)-CaCl₂ verwendet und mit Ausnahme von Gl-6-Phosphatase und ATPase vor der eigentlichen Reaktion.

Für den Glycogen Nachweis (PAS Reaktion) wurde als Fixiermittel abs. Alkohol bzw. Carnoy Lösung verwendet (Carnoy Lösung = 60% abs. Alkohol, 30% Chloroform, 10% Essigsäure). Die für die histoserologische Untersuchungen bestimmten Schnitte wurden in abs. Alkohol bei -30 bzw. -70°C fixiert.

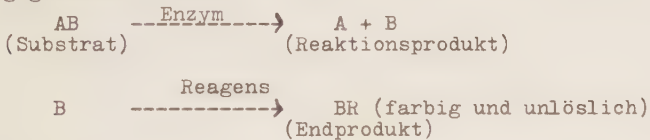
Histochemische Methoden

Die Histochemie und Cytochemie sind dadurch ausgezeichnet, dass sie ausser der chemischen Beschaffenheit der Gewebezellen auch die topographische Lokalisation im Gewebe ermöglichen.

Die Enzym-histochemischen Untersuchungen wurden nach dem Prinzip der Metallsalz-Methode durchgeführt. Diese Methoden werden abgeleitet von der zum Nachweis von alkalischen Phosphatase erfundenen Methode von TAKAMATSU u. GOMORI (24) (1939). Zum erstenmal wurden erprobt
Saure Phosphatase (GOMORI) 1941
Gl-6-Phosphatase (CHIUQUINE) 1953
ATPase (GLICK u. FISCHER) 1945.

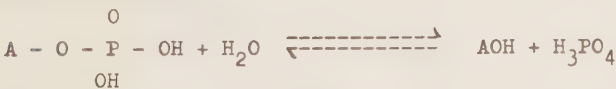
Die Enzymhistochemie basiert auf dem Funktionsnachweis der Enzyme; d. h. auf ihrer Fähigkeit, eine bestimmte chemische Reaktion im Gang zu setzen. Da die Enzyme Proteine sind und durch Farbreaktion schwer voneinander zu unterscheiden sind, richtet sich die Aufmerksamkeit auf das Reaktions-Produkt der enzymatischen Aktivität. Aus seiner Lage und Menge wird auf die Lage und Aktivität des Enzyms geschlossen. Um dies möglich zu machen, müssen die Reaktionsprodukte der Enzyme unlöslich sein oder durch zusätzliche Reaktionen in eine unlösliche Form überführt werden. Ausserdem müssen die betreffenden Reaktionsprodukte farbig sein, oder in farbige Verbindungen überführt werden.

Die Nachweisreaktion soll auf folgende schematische Gleichung gebracht werden:

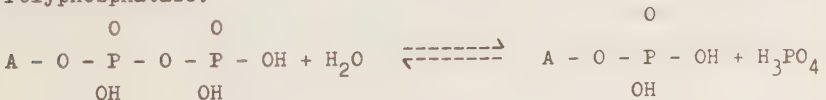


Der Nachweis verläuft über die Ausfällung einer enzymatisch freigesetzten Säuregruppe durch ein Metallion, welches in die Inkubationslösung hineingebracht wird. Das im Gewebeschnitt gebildete farblose Metallsalz muss dann in einer sekundären Reaktion zu einem schwarzen Sulfid umgewandelt werden, welches den Sitz der enzymatischen Aktivität markiert.

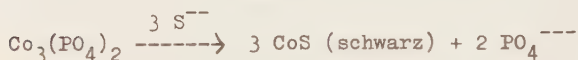
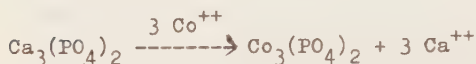
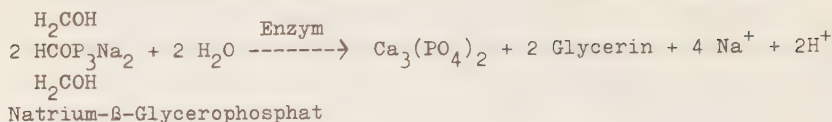
Monophosphatase:



Polyphosphatase:



Beispiel: Alkalische Phosphatase



Im alkalischen Milieu (pH 8,5), hat sich die Verwendung von Ca^{++} in der Inkubationslösung als zweckmässig erwiesen. Im neutralen Bereich dagegen Bleiionen. Das Fällungsprodukt von Phosphat mit Blei ist nach PRATT (1954)(11) ein Pyromorphit; es ist ein weisses Salz, welches bei histochemischen Untersuchungen sekundär in Bleisulfid umgewandelt werden muss.

Übersicht der Reaktionen

<u>Ferment</u>	<u>Substrat</u>	<u>pH-optimum</u>	<u>Aktivator</u>
Gl-6-Phosphatase	Gl-6-Phosphat	6,5	Ca^{++}
alk. Phosphatase	Phosphomonoester	9,2 - 9,4	Mg^{++}
saure Phosphatase	Phosphomonoester	5,2 - 5,4	Ca^{++}
ATPase	ATP	7,4	Mg^{++}

(Mitochondrien)

Angewandte Methoden

Gl-6-Phosphatase: Der Nachweis wurde nach WACHSTEIN u.

MEISEL ausgeführt (6). Die Stammlösung besteht aus:

0,2 M Trismaleat Puffer pH 6,7

2% Bleinitrat

Aqua dest.

Als Substrat wurde Gl-6-Phosphat Natriumsalz (Böhringer u. Söhne, Mannheim) verwendet.

Saure Phosphatase: Der Nachweis wurde nach GOMORI (7) Methode ausgeführt. Als Substrat wurde Natrium- β -Glycerophosphat Merck-Darmstadt verwendet. Die Stammlösung besteht aus:

0,2 M Natriumacetat Puffer

2% Bleinitrat auf pH 5.

Alkalische Phosphatase (7): Der Nachweis wurde nach GOMORI Methode ausgeführt. Als Substrat wurde Natrium- β -Glycerophosphat Merck-Darmstadt benutzt. Die Stammlösung besteht:

2% Veronal-Na

2% CaCl_2

5% MgSO_4

an Stelle von Bleinitrat wurde nach der Inkubation Kobaltnitrat verwendet.

ATPase (8): Für den Nachweis von ATP (Mitochondrien) wurde folgendes Rezept verwendet:

25 mg ATP-Natriumsalz (Böhringer Werke Mannheim)

22 ml Aqua dest.

20 ml 0,2 M Trismaleat Puffer pH 7,2

3 ml 2% Bleinitrat

5 ml 0,1 M MgSO_4

Im Mittelpunkt des histochemischen Nachweises von Kohlenhydraten steht die PAS Reaktion (periodic-acid-Schiffreaktion) McMANUS, LILLIE u. HOTCHKISS. Sie beruht auf der Oxydation von 1,2-Glycolen durch Perjodsäure und den Nachweis der hierbei gebildeten Aldehyde mit dem Schiffischen Reagens. Perjodsäure wurde wie folgt hergestellt:

1 gr Natriumperjodat

100 ml Aqua dest.

0,9 - 1 ml 40% Salpetersäure

Schiffisches Reagens:

Lösung I: 0,5 gr Pararosanilin Merck

15 ml 10% Salzsäure

Lösung II: 0,5 gr Kaliummetasulfit in 85 ml Aqua dest. Die beiden Lösungen wurden zusammengeschüttet.

Die immunhistologische Untersuchungen wurden mit dem Fluoreszenzoptischen Verfahren von COONS u. KAPLAN, und zwar mit der direkten oder "one-step" Methode durchgeführt (9). Bei dieser Methode wird das homologe markierte Antiserum auf dem histologischen Schnitt aufgebracht und von dem Zell-Antigen spezifisch gebunden. Nach Abspülen des überschüssigen, nicht gebundenen AS, ist der gebildete AG-AK Komplex im Fluoreszenzmikroskop als leuchtendes Gebilde sichtbar, und zwar in charakteristischer gelb-grüner Färbung, gut zu unterscheiden von der Eigenfluoreszenz des Gewebes.

Direkt-Methode

Technik der Fluorescein-iso-thiocyanat-Konjugation.

Die Methode von BIGGS (10) wurde von John D. Marshall u.a. verfeinert. Das Kaninchen Antiserum (AS) auf Lebergewebe-spezifisches Antigen wird folgendermassen weiter verarbeitet:

) Das AS wurde durch Präparation der γ -Globulin Fraktion konzentriert um erhöhten Antikörper-titer zu erhalten: 50 mg Globulin in 4,5 ml 0,15 M NaCl mit 0,5 ml 0,5 M Natriumacetat-Puffer pH 9 lösen. Dieser Lösung wird noch 2,5 mg Fluoresceiniso-thiocyanat hinzugefügt und das Ganze auf 4°C gekühlt. Zur Entfernung nichtgebundenen fluoreszierenden Farbstoffes wurde der Ansatz nach 18 stündiger Rührung bei 4°C über eine Sephadex-g-25 Säule gegeben. Danach wurde durch Druckdialyse konzentriert.

Übersicht über die Veränderungen der Glucose-6-Phosphatase-Aktivität in der Rattenleber nach Verabfolgung von Nitrosaminen

Der Glucose-6-Phosphatase wird in der Leber vor allem die Funktion zugeschrieben, durch Abspaltung des Phosphats Glucose dem Blut zuzuführen. Kürzlich wurde nachgewiesen, dass das Ferment auch die Reaktion

$\text{Pyrophosphat} + \text{Glucose} = \text{Glucose-6-phosphat} + \text{Phosphat}$
durchführen kann (12). Das Ferment, das ausser in der

Leber auch noch in einigen anderen Organen vorkommt (vgl. W. GÖSSNER u. H. FRIEDRICH-FREKSA)(13) ist ausschliesslich in der Mikrosomenfraktion der Zelle enthalten.

Bei normalen Ratten, die nicht frisch gefüttert sind, gibt jede Leberparenchymzelle eine starke Reaktion auf Glucose-6-phosphatase nach der früher beschriebenen Methode von WACHSTEIN u. MEISEL (vgl. Abb. 1, oben). Bei frisch gefütterten Ratten wird die Reaktion um die Zentralvene herum schwächer und man kann einen deutlichen Gradienten des Reaktionsabfalles in der Richtung von der Glisson'schen Kapseln zur Zentralvene erkennen.

Die Verabfolgung der Cancerogene Diäthylnitrosamin (DAENA) und Nitrosomorpholin (NM) und dem kaum cancerogenen aber stark toxischen Thioacetamid (TAA) in einer Dosierung von 8 mg/Kg Ratte führt in den ersten 4 Wochen zu übereinstimmenden Ergebnissen. Schon nach den ersten Tagen der Fütterung ist bei allen Tieren eine starke Verringerung der Glucose-6-phosphatase-Reaktion bis zum völligen Ausfall um die Zentralvene herum zu erkennen. Bei weiterer Fütterung erstrecken sich diese Bereiche in Richtung auf die Zentralvene des nächsten Läppchens, so dass sie schliesslich miteinander confluieren. Demgegenüber bleibt die Reaktion in den peripheren Bereichen um die Glisson'schen Kapseln herum erhalten.

Durch die Verbindung der Glucose-6-phosphatase-freien Bereiche wird die Leber schliesslich in ein Netzwerk zerlegt, das anmutet wie Strassenzüge in einer Stadt. Ich werde den Ausdruck "Strassen" für diese Erscheinung beibehalten. Ein eigener Ausdruck ist erforderlich, weil sich zeigen wird, dass dieser Vorgang in scharfem Gegensatz steht zu Umänderungen, die erst nach 4 Wochen eintreten.

Abb. 2 u. 1 zeigen diese Erscheinungen. In 2 oben, ist auf einem Schnitt die Leber einer Ratte, die mit DAENA behandelt wurde, zu sehen, zusammen mit einem zweiten Schnitt aus der Leber einer Ratte, die mit Thioacetamid behandelt wurde.

In Abb. 1 ist eine normale Leber der Leber eines mit Thioacetamid behandelten Tieres gegenübergestellt. In beiden Fällen war die Behandlung 56 Tage lang durchgeführt worden. Nach dieser Einwirkungsdauer sind die Glucose-6-phosphatase-freien Bereiche nach Behandlung mit Nitrosaminen viel grösser als nach Behandlung mit Thioacetamid, während sich in den ersten Wochen in dieser Beziehung keine wesentlichen Unterschiede erkennen lassen.

Die Tatsache, dass die Bildung von "Strassen" auch mit dem kaum cancerogenen Thioacetamid eintritt, weist bereits darauf hin, dass es sich hier um Veränderungen handelt, die nicht notwendig mit der Cancerogenese in Zusammenhang stehen. Das wird weiter dadurch erwiesen, dass diese Veränderungen reversibel sind, wenn die Verabfolgung von Thioacetamid oder von Nitrosamin nach wenigen Tagen abgebrochen wird und die Versuchstiere dann erst nach einigen Wochen untersucht werden. Die Leber lässt sich dann von einer normalen Leber nicht mehr unterscheiden. Entsprechende Veränderungen sind in der Literatur bereits bei Einwirkung von Tetrachlorkohlenstoff und anderen Lebergiften (vgl. z.B. A. M. RAPAPORT (20) erwähnt worden.

Im Gegensatz zu diesen reversiblen und unspezifischen Veränderungen stehen andere Erscheinungen, die (bei einer Dosis von 8 mg/Kg) etwa 4 Wochen nach Behandlungsbeginn auftreten. Es handelt sich um die bereits von GÖSSNER u. FRIEDRICH-FREKSA (13) beschriebenen, scharf abgegrenzten Inseln, die frei von Glucose-6-phosphatase sind (vgl. Abb. 3 und 8). Diese Inseln treten nach Behandlung mit Nitrosaminen auf, nicht nach Behandlung mit Thioacetamid, und sind insofern spezifisch. Der grösste Teil dieser Inseln stellen irreversible Veränderungen dar, denn auch nach

Abbruch der Behandlung mit Cancerogenen bleiben sie bestehen. Die Inseln sind frei von Glucose-6-phosphatase und haben in der ersten Zeit mehr Glycogen als die umgebenden Zellen, was besonders nach Hunger deutlich wird (Abb. 7). Das ist leicht verständlich, weil ja die Glucose-6-phosphatase notwendig ist, um im Glycogen gespeicherte Glucose ins Blut überzuführen. Allerdings können die Inseln nach einigen Wochen das Glycogen völlig verlieren und es scheint, dass es dann in ihnen nicht mehr gebildet werden kann. Die Spaltung von ATP (pH 7,2) in den Inseln ist ~~st~~ vermindert. Die Aktivität der sauren Phosphatase bleibt meist unvermindert; es kam öfters vor, dass in einem Teil dieser Bereiche mosaikartig eine Erhöhung der Aktivität von saurer Phosphatase nachweisbar war, es gab aber auch Fälle, in denen eine Verminderung vorkam.

Neben diesen Glucose-6-phosphatase-freien Bereichen, die schon nach etwa 4 Wochen auftreten, können später, nach etwa 11 Wochen, auch ebenfalls scharf umgrenzte Bereiche beobachtet werden, in denen die Glucose-6-phosphatase lediglich deutlich vermindert ist und die ich deshalb als "graue" Inseln bezeichne. Sie verhalten sich im übrigen ähnlich wie die Glucose-6-phosphatase-freien Inseln. Höchst überraschend ist aber, dass ausserdem auch noch Inseln auftreten können, in denen die Glucose-6-phosphatase-Aktivität deutlich erhöht ist. Eine solche Insel ist in Abb. 4 und in der linken oberen Hälfte von Abb. 8 dargestellt. Diese "schwarzen" Inseln zeigen von vorneherein ein Fehlen von Glycogen, wie es bei der erhöhten Glucose-6-phosphatase-Aktivität auch zu erwarten ist.

Die Figur 1 gibt eine Übersicht über den zeitlichen Ablauf der Ereignisse. Insgesamt wurde die Behandlung 8 Wochen durchgeführt. Jedesmal wurden 3 Tiere getötet;

2 davon waren normal gefüttert und 1 vor der Obduktion 12 Std. ohne Futter gehalten worden. Die "Strassen" sind von der 1. Woche an bis nach der 11. Woche zu beobachten. Die Glucose-6-phosphatase-freien Inseln treten nach 4 Wochen auf, nach 11 Wochen die schwarzen und grauen, nach 16 Wochen ist eine verstärkte Basophilie in diesen Bereichen nachweisbar. Erst von jetzt ab kann das Auftreten von Mikrocarcinomen und Carcinomen diagnostiziert werden.

Hervorzuheben ist, wie gleichmässig der zeitliche Ablauf der Veränderungen im Lebergewebe bei verschiedenen Tieren erfolgt. In der Versuchsserie Fig. 1 kann bei den Versuchstieren das erste Auftreten der weissen Inseln nach 5 Wochen beobachtet werden, das Verschwinden der "Strassen" nach 11 Wochen (3 Wochen nach dem Stoppen) und ebenso das Auftreten der schwarzen und grauen Inseln nach 11-12 Wochen. In Dauerfütterungsversuchen, die noch im Anhang aufgeführt sind (1-2), beträgt die maximale Differenz im Auftreten von weissen Inseln bei gleichartig behandelten Ratten 2 Wochen. Obgleich der zeitliche Verlauf so übereinstimmend bei verschiedenen Tieren ist, so ist doch die Grösse der aufgetretenen Inseln bei verschiedenen Versuchstieren schwankend. Allerdings sind immer nur einige ausgewählte Bezirke aus der Leber untersucht worden, so dass dieser Unterschied sich vielleicht verringern würde, wenn man den Durchschnitt der gesamten Leber bestimmt (Die Versuche mit DAENA Behandlung sind viel gleichmässiger als die mit Nitrosomorpholin).

Der relative Anteil von schwarzen, grauen und weissen Inseln geht aus Tabelle 6 hervor. Bei den Tieren der Versuchsserie Fig. 1 wurden vom ersten Auftreten der schwarzen und grauen Inseln 3 Wochen nach Abbruch der Nitrosaminbehandlung an, je 30 Inseln in jeder Woche gezählt (10 pro Tier) und

der Anteil an weissen, grauen und schwarzen Inseln angegeben und auf Prozent umgerechnet. Ausserdem sind auch gemischte Inseln (M) vorhanden, das sind umschriebene Bereiche, welche ihre Enzymaktivität nur teilweise verloren haben, d.h. der Verlust ist im ganzen Inselbereich unregelmässig verteilt. Der Anteil dieser gemischten Inseln schwankt zwischen 17 und 27%, der weissen ebenfalls zwischen 17-27%, der grauen zwischen 20-33% und der schwarzen zwischen 23-33%. Die prozentualen Unterschiede zeigen keinen Gang bei den Tieren, die nach 3 Wochen und solchen, die nach 12 Wochen nach Abbruch des Cancerogens untersucht wurden. Demnach kann angenommen werden, dass jeder der vier verschiedenen Zustände vom ersten Auftreten an etwa gleich häufig vorkommt.

Irreversibilität und Wachstum der Inseln

Wenn man eine für die Krebsentstehung bei allen Versuchstieren mehr als ausreichende Gesamtdosis DAENA von 450 mg/kg Ratte verabfolgt, danach die Behandlung abbricht und mehrere Monate wartet bis Tumoren aufgetreten sind, so ist neben dem normalen Lebergewebe fast nur noch Tumorgewebe, aber Inselgewebe kaum noch zu erkennen. Danach ist zu vermuten, dass sich alles Inselgewebe in Krebsgewebe umgewandelt hat. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass sich das Inselgewebe zurückbildet, wenn die Behandlung mit dem Cancerogen abgesetzt wird. Um diese Frage weiter zu untersuchen, wurde bei 8 Tieren nur eine Woche lang DAENA gegeben, insgesamt 56 mg/kg Ratte. Je 2 Tiere wurden nach Abbruch der Behandlung obduziert (Tab. 5). Bei einem der Tiere konnte 84 Tage nach Beginn eine kleine Insel gefunden werden, die frei von Glucose-6-phosphatase war. Ferner wurde eine einzige Glucose-6-phosphatase-freie Zelle, inmitten von normalen Leberzellen gefunden (Abb. 5). Bei den später obduzierten Tieren fanden sich etwas grössere Inselbereiche und

auch gelegentlich die Ausbildung von Inseln mit verstärkter Enzymaktivität. Ferner wurde in einem Fall ein Mikrocarcinom gefunden (Diagnose: Prof. LETTERER, Pathologisches Institut, Tübingen). Abb. 6 zeigt eine Insel, die bei einem der 30-Wochen-Tiere gefunden wurde. Aus diesen Versuchen ist zu schliessen, dass wenigstens ein Teil des Inselgewebes irreversibel ist.

Eine weitere wichtige Frage betrifft das Wachstum der Inseln. Wachsen die Inseln ganz allmählich zum Carcinom heran oder ist der Umschlag zum Carcinom ein neuer Schritt? Ob die Inseln aus einer einzigen Zelle entstehen ist unmittelbar nicht festzustellen. Die Zahl der Zellen in einer Insel beträgt oft in den Anfangsstadien schätzungsweise 500-1000 Zellen. Zwar können gelegentlich in Stichproben auch Einzelzellen gefunden werden (wie in Abb. 5), aber nur eine vollständige Schnittserie könnte hier entscheiden, ob nicht in der Nachbarschaft auch weiteres Inselgewebe vorkommt. Doch würde selbst der Nachweis einer einzelnen isolierten Zelle nicht viel besagen, da die Determination schon früher eingetreten ist. Wenn eine Zelle kein Enzym bilden kann, so muss doch das in der Zelle vorhandene Enzym erst verschwinden, was je nach der Halbwertszeit des Enzyms Tage oder Wochen dauert. Bei irgend einer Zelle kann der Verlust zuerst erkennbar sein; daraus kann noch nicht geschlossen werden, dass aus dieser Zelle das übrige Inselgewebe entsteht.

Um das Wachstum der Inseln zu verfolgen wurde versucht, die Fläche des Inselgewebes in Relation zum normalen Lebergewebe in Stichproben auf Schnitten zu messen (Methode im Anhang). Das Ergebnis zeigt Fig. 2. In dieser Versuchsserie wurden die Ratten zunächst 8 Wochen mit DAENA behandelt (Gesamtdosis 448 mg/kg Tier; 3 Wochen nach Stopp der Behandlung, wenn die "Strassen" zurückgebildet sind,

wurde die Untersuchung begonnen. Nach jeweils 3, 4, 5, 8, 9 und 12 Wochen nach Abbruch der Behandlung wurden je 3 Tiere obduziert, 2 nach normaler Fütterung, 1 Tier nach einer mehrstündigen Hungerzeit. Diese Unterscheidung wurde als Kontrolle durchgeführt, weil bei Hunger die Glucose-6-phosphatase-Reaktion sich verstärkt. Von jedem der Tiere wurden 10 Schnitte ausgewählt und das Flächenverhältnis Inselgewebe/Gesamtgewebe bestimmt; die einzelnen Werte sind als Querstriche in das Diagramm eingetragen. Es zeigte sich, dass zwischen 3-8 Wochen einschliesslich kein wesentlicher Unterschied im Flächenverhältnis besteht. Auch zwischen gefütterten und Hungertieren ist kein Unterschied zu finden. Einzelne Stichproben erreichen bei den 8-Wochen-Tieren Werte über 40%, die bei den früheren Stadien noch nicht erreicht wurden. Erst von der 9. Woche ab, setzt ein stärkeres Wachstum bei einzelnen Inseln ein. Das ist die gleiche Zeit in der erstmals zahlreiche Mitosen zu sehen sind, das Zellplasma des Inselgewebes sich basophil zu färben beginnt und die ersten Mikrocarcinome diagnostiziert werden. Man vergleiche Fig. 1 u. 2, wobei für den Zeitvergleich in Fig. 2 8 Wochen in Abzug gebracht werden müssen (Es war in beiden Fällen die gleiche Versuchsreihe).

Histochemische Untersuchung der Tumoren

Wenn aus den Inseln die Carcinome entstehen, so muss die histochemische Mannigfaltigkeit der Inseln auch bei den Tumoren zu finden sein. Die Tabellen zeigen, dass dies auch der Fall ist. Tab. 7 gibt die Auswertung eines Versuches wieder, bei dem 22 Carcinome bei insgesamt 13 Tieren untersucht wurden. In dieser Versuchsserie waren bei Rattenmännchen des Wistar Stammes 5 mg DAENA/kg täglich im Trinkwasser gegeben. Die Fütterungsdauer betrug 15 Wochen; die Gesamtdosis 525 mg/kg Tier. 15 Wochen nach Beginn wurde mit der Behandlung aufgehört und weitere 16 Wochen gewartet, bis die Tumoren aufgetreten waren.

Aus der Spalte mit den Glucose-6-Phosphatase-Werten ergibt sich, dass von 22 Tumoren 9 Glucose-6-Phosphatase negativ waren. 7 zeigten eine mosaikartige Verteilung von Glucose-6-Phosphatase enthaltenden und -freien Zellen, 2 einen verminderten Betrag von Glucose-6-phosphatase, entsprechend den grauen Inseln, 3 Tumoren entsprechen im Glucose-6-phosphatase-Gehalt einer normalen Leber und einer zeigt einen verstärkten Gehalt, entsprechend den schwarzen Inseln. Starke Unterschiede zeigen sich auch im Glycogengehalt der Tumoren, wobei Glucose-6-phosphatase-Verlust mit Glycogen-Verlust parallel gehen kann, aber auch bei normalem Glucose-6-phosphatase-Gehalt kann das Glycogen verschwinden (Tier Nr. 1, Tumor C). Umgekehrt hat Glucose-6-phosphatase-Verlust nicht notwendig den Glycogen-Verlust zur Folge. Auch die ATPase Aktivität (pH 7,2) kann bei den Tumoren entweder vorhanden sein oder fehlen. Ein gemischtes Verhalten wurde hier nicht gefunden. Die Stärke der Reaktion bei der sauren Phosphatase schwankt, aber die Enzymaktivität fehlt nie vollständig. Die alkalische Phosphatase, die in normalen Leberparenchymzellen nicht nachweisbar ist, kann bei Tumorzellen auftreten.

Ein im wesentlichen gleichartiges Verhalten zeigt eine zweite Versuchsserie, bei der an 18 Tieren 26 Tumoren untersucht wurden (Tab. 8). In dieser Serie wurden Weibchen des Sprague Dawley Stammes verwendet und ebenfalls mit DAENA behandelt. Die Dosis 8 mg/kg Tier/Tag wurde für 8 Wochen gegeben. Die Tiere gelangten nach 6 weiteren Monaten zur Obduktion. In diesem Fall fehlte bei 10 Tumoren die Glucose-6-phosphatase, bei 6 war ein Mosaik vorhanden, 9 hatten einen verminderten Gehalt und bei einem Tumor war die Reaktion erhöht (Abb. 18) im Vergleich zur normalen Leberzelle. In dieser Versuchsserie gelangte neben den im vorigen Abschnitt bereits beschriebenen histochemischen Untersuchungen auch das gewebsspezifische Antigen zur Auswertung, mit Hilfe der im methodischen Teil beschriebenen Technik mit fluoreszierenden

Antikörpern. Bei einem der Tumoren entspricht der Antigengehalt auf Grund der Fluoreszenz dem der normalen Leberzelle. Bei 16 Tumoren ist das Antigen nicht mehr nachweisbar, 8 Tumoren haben einen verminderten Gehalt und einer zeigt ein gemischtes Verhalten. Die letzte Spalte dieser Tabelle gibt den Fettgehalt wieder. In den Kontrollen ist mit dieser Methode kein Fett nachweisbar, während es bei den Tumoren häufig, aber nicht immer, auftritt.

Die Tab. 9 zeigt noch einige Versuche mit Nitrosomorpholin. Hier waren von 10 Tumoren 9 frei von Glucose-6-phosphatase und einer hat einen verstärkten Gehalt. Bei einem Tumor, der frei von Glucose-6-phosphatase ist, tritt sehr verstärkt Glycogen auf. Bei der ATPase findet sich in dieser Serie nie ein völliges Fehlen.

Die Abbildungen 11 - 20 veranschaulichen die in den Tabellen dargestellten Ergebnisse in Bezug auf Glucose-6-phosphatase. 15 sowie 10 zeigen einen teilweise Glucose-6-phosphatase haltigen Tumor und stellen je einen Tumor mit vollständigem Enzymverlust dar und 17 und 19 oben einen Tumor, bei dem Verlust von Glucose-6-phosphatase sich mosaikartig mischt mit einem verminderten Gehalt (bei 17 im Originalpräparat ist das besser zu erkennen als auf der Abbildung); unten findet sich eine fettige Degeneration. Die Abb. 11 ist ein Kombinationspräparat von 2 Tumoren vom gleichen Tier. Sie wurden mit fluoreszierenden Antikörpern behandelt. Der Tumor rechts oben hat Antigen und fluoresziert deshalb, er erscheint im Bild hell, während der Tumor links unten das Antigen verloren hat und deshalb im Fluoreszenzbild dunkel erscheint. In Abb. 12 ist ebenfalls ein Kombinationspräparat der beiden Tumoren dargestellt: der Tumor A links unten hat die Glucose-6-phosphatase verloren, während der Tumor B auf der rechten Seite sich in 2 Bereichen aufspaltet, von denen der obere Glucose-6-phosphatase-haltig, der untere davon frei ist. Es

ist möglich, dass diese Anordnung dadurch entstanden ist, dass 2 Inseln, die verschieden reagierten, zu einem Tumor zusammengewachsen sind. Abb. 13 zeigt einen Tumor mit deutlichem Mosaik von Glucose-6-phosphatase-haltigen und Glucose-6-phosphatase-freien Zellen. In 14 unten ist beim gleichen Tumor mit fluoreszierendem Antigen behandelt worden; es zeigt sich auch hier ein Mosaik von Antigen-freien und Antigen-haltigen Zellen.

Besprechung der Ergebnisse

Die histochemische Untersuchung der Inseln und der Tumoren ermöglicht es, verschiedene Zellzustände zu erfassen. Allein in der Ausprägung der Glucose-6-phosphatase-Reaktion sind 4 deutlich voneinander abgegrenzte Stufen zu unterscheiden: negative Reaktion (weisse Inseln), geringer als normal (graue Inseln), normales Verhalten (keine Inseln) und verstärkte Reaktion (schwarze Inseln). Auch bei der ATPase-Reaktion und der Glycogen-Reaktion sind diese Stufen zu unterscheiden. Beim Gehalt an gewebsspezifischem Antigen wurde bisher eine verstärkte Reaktion nicht aufgefunden, aber die 3 Stufen: normaler Gehalt, verminderter Gehalt und Fehlen sind ebenfalls nachweisbar. Würden sich diese verschiedenen Zellzustände rein statistisch unabhängig voneinander verteilen, so sollte bereits eine einzige Insel oder ein einziges Carcinom eine grosse Anzahl verschiedener Zellzustände enthalten. Demgegenüber zeigt sich, dass bei einer einzigen Insel und einem einzigen Carcinom für sich in mehr als der Hälfte der Fälle alle Zellen gleich reagieren. In einer geringeren Anzahl findet sich ein Mosaik aus 2 verschiedenen Zellarten. Beim Carcinom kann es ausserdem zum Auftreten verschiedener Bereiche kommen, die noch deutlich erkennen lassen, dass sie aus verschiedenen, in sich homogenen Inseln entstanden sind.

Die einfachste Deutung dieses Tatbestandes besteht in der Annahme, dass eine Insel nur aus einer einzigen Zelle entsteht. Wenn ein ganzer Zellbereich durch Nitrosamin in gleicher Weise verändert wird, ist nicht zu begreifen, wie so andere Bereiche andere Umänderungen erleiden.

Die Tatsache, dass nicht nur Ausfall der Enzymaktivität, sondern auch eine Verstärkung auftreten kann, spricht dafür, dass es sich hier nicht um einfache Ausfälle der Enzymaktivität (Deletionstheorie, MILLER, 1947)(14) sondern um Störung der Regulation der Enzymsysteme (Deviation, POTTER, 1961)(15) handelt.

Wie mit kurzfristigen Nitrosamingaben bewiesen werden konnte, tritt eine Determination von Inselzellen schon in den ersten Wochen der Behandlung ein. Die Inseln wachsen aber sehr langsam, bis nach Monaten mit einem explosionsartigen Wachstum das Carcinom erkennbar wird.

Ebenso wie die Inseln weisen die Carcinome, auch wenn sie an demselben Tier entstanden sind, ein für die Zellen eines Carcinoms im allgemeinen einheitliches, aber für ein anderes Carcinom wieder verschiedenes Enzymmuster auf. Dieses Ergebnis steht in guter Übereinstimmung mit den immunologischen Untersuchungen an chemisch induzierten Tumoren.

KLEIN(16) und **FELDMAN** fanden, dass Sarkome, die an derselben Maus mit Benzpyren erzeugt wurden, sich immunologisch unterscheiden. Aus diesen Versuchen folgt ebenfalls, dass die Kombinationsmöglichkeit der verschiedenen Veränderungen, die bei der chemischen Cancerogenese auftreten können, so gross ist, dass der Eindruck eines jeweils für jeden Tumor individuellen Spektrums von Veränderungen entsteht.

Zusammenfassung

Beim Vergleich der Veränderungen, die sich in der Rattenleber nach Behandlung mit dem für die Leber toxischen, aber nicht cancerogenen Thioacetamid und den beiden Cancerogenen Diäthylnitrosamin und Nitrosomorpholin ergeben, finden sich in den ersten 4 Wochen qualitativ keine Unterschiede. Die in dieser Zeit auftretenden Veränderungen sind reversibel; sie bilden sich nach Aufhören der Applikation der Stoffe zurück. Demgegenüber treten bei den cancerogenen Stoffen bei der Dosis von 8 mg/kg Ratte 5 Wochen nach Beginn der Behandlung scharf abgegrenzte Zellinseln auf, die sich in histochemischen Reaktionen von der Umgebung unterscheiden. Die auftretenden Veränderungen sind innerhalb einer Insel gleichartig oder zeigen höchstens 2 verschiedene Reaktionen. Dagegen ist der Reaktionsausfall von Insel zu Insel verschieden. Auch bei einer kleinen Dosis, die für die Cancerogenese noch nicht ausreicht, treten in geringer Zahl Inseln auf, die auch ein halbes Jahr nach Abbruch der Behandlung beobachtet werden können; ein Zeichen, dass diese Inseln irreversible Veränderungen darstellen. Die Inseln wachsen auch bei weiterer Cancerogenbehandlung nur sehr langsam, bis einzelne, frühestens nach 4 Monaten, anfangen, sich in Tumoren umzuwandeln. Zu dieser Zeit erfolgt eine starke Vergrößerung, verbunden mit dem Auftreten von Basophilie im Plasma und von Mitosen. Auch die Carcinome weisen ein von Carcinom zu Carcinom verschiedenes histochemisches Spektrum auf. Da einzelne Carcinome aber auch durch Confluieren mehrerer Inseln entstehen können, kann die Mannigfaltigkeit ihrer Zelltypen grösser sein als bei einer einzelnen Insel.

Anhang

Dauerfütterungsversuche

(1) Nitrosomorpholin

Rattenstamm: Sprague-Dawley ♂♂

Dosis: 8 mg/Kg/Tier/Tag (mit der Sonde) Nitrosomorpholin

Tiergewicht: ca. 200 gr

Jedesmal wurden 2 Tiere getötet. In dem Zeitabstand von Fütterungsanfang bis Tötung lagen: 1 Tag, 2 Tage, 1 Woche, 2 Wochen, 3 Wochen, 6 Wochen, 14 Wochen, 17 Wochen.

Schon am zweiten Tag vor Verlust der Gl-6-Phosphatase Aktivität um die Zentralvene im schmalen Parenchymbereich feststellbar ("Strasse"). Erst nach 4 Wochen Dauerfütterung tritt neben dem oben erwähnten Enzymverlust zusätzlich bei einem Tier inselartiger Verlust auf.

An Tieren, die 6 Wochen gefüttert waren, waren Inseln nur an einem Tier vorhanden.

Die 14 und 17 Wochen lang gefütterten Tiere, waren bei beiden Tieren Inseln aufgetreten. Die Grösse der "Inseln" von Tier zu Tier zeigte kleine Unterschiede.

Tabelle 1

Tier Nr.	Ges. Dosis	Fütterungs- dauer	"Strassen"	"Inseln"
16	1,6 mg	1 Tag	-	-
15	1,6 mg	1 Tag	-	-
11	3,2 mg	2 Tage	+	-
12	3,2 mg	2 Tage	+	-
13	4,8 mg	3 Tage	+	-
14	4,8 mg	3 Tage	+	-
1	11,2 mg	1 Woche	+	-
2	11,2 mg	1 Woche	+	-
3	22,4 mg	2 Wochen	+	-
4	22,4 mg	2 Wochen	+	-
5	33,6 mg	3 Wochen	+	-
6	33,6 mg	3 Wochen	+	-
7	44,8 mg	4 Wochen	+	+
8	44,8 mg	4 Wochen	+	-
9	67,2 mg	6 Wochen	+	-
10	67,2 mg	6 Wochen	+	+
12	156,8 mg	14 Wochen	+	+
18	156,8 mg	14 Wochen	+	+
19	190,4 mg	17 Wochen	+	+
20	190,4 mg	17 Wochen	+	+

(2) Rattenstamm: Sprague-Dawley ♂♂

Dosis: 1 mg/Kg/Tier/Tag (mit der Sonde) Nitrosomorpholin

Tiergewicht: ca. 200 gr.

Tabelle 2

Tier Nr.	Ges. Dosis	Fütterungs- dauer	"Strassen"	"Inseln"
A	22,4 mg	16 Wochen	+	-
B	22,4 mg	16 Wochen	+	-
C	28 mg	20 Wochen	+	-
D	28 mg	20 Wochen	+	+

(3) DAENA

Rattenstamm: Sprague-Dawley ♀♀

Dosis: 8 mg/Kg/Tier/Tag (mit der Sonde) DAENA

Tiergewicht: ca. 200 gr.

Drei Tiere wurden jedesmal getötet, davon ein Tier, welches 12 Stunden vorher kein Futter mehr bekommen hat.

Die Zeitwerte waren ab Fütterungsbeginn bis zur Tötung:

4 Tage, 1 Woche, 2 Wochen, 4 Wochen, 6 Wochen, 8 Wochen, 10 Wochen (Abb.). Strassenartiger Enzymverlust ist schon nach 4 tägiger Fütterungsdauer nachweisbar; zusätzlich, nach 4 Wochen Fütterungsdauer, sind "Inseln" nachweisbar und zwar regelmässig an sämtlichen Versuchstieren. Bei den Tieren, die vorher gehungert hatten, wurde eine Glycogen Ansammlung in den Inseln festgestellt.

Tabelle 3

Tier Nr.	Ges. Dosis	Fütterungs- dauer	"Strassen"	"Inseln"
1	6,4 mg	4 Tage	+	-
2	6,4 mg	4 Tage	+	-
Hunger a	6,4 mg	4 Tage	undeutlich	-
3	11,2 mg	1 Woche	+	-
4	11,2 mg	1 Woche	+	-
Hunger b	11,2 mg	1 Woche	+	-
5	22,4 mg	2 Wochen	+	-
6	22,4 mg	2 Wochen	+	-
Hunger c	22,4 mg	2 Wochen	+	-
7	44,8 mg	4 Wochen	+	-
8	44,8 mg	4 Wochen	+	+
Hunger d	44,8 mg	4 Wochen	+	undeutlich
9	67,2 mg	6 Wochen	+	+
10	67,2 mg	6 Wochen	+	+
Hunger e	67,2 mg	6 Wochen	+	+
11	89,6 mg	8 Wochen	+	+
12	89,6 mg	8 Wochen	+	+
Hunger g	Gestorben			
13	112 mg	10 Wochen	+	+
14	112 mg	10 Wochen	+	+
Hunger h	112 mg	10 Wochen	+	+

(4) Rattenstamm: Sprague-Dawley ♂♂

Dosis: 5 mg/Kg/Tier/Tag (im Trinkwasser) DAENA

Tiergewicht: 200-350 gr.

In regelmässigen Abständen ab Fütterungsanfang wurden je 3 Tiere getötet; und zwar 2, welche bis zu ihrer Tötung normales Futter und Cancerogen bekommen hatten. Ein zusätzliches Tier hat 12 Stunden vor seinem Tode ausser dem Cancerogen keinerlei Futter bekommen.

Tabelle 4

Tier Nr.	Ges. Dosis	Fütterungs- dauer	"Strassen"	"Inseln"
1	280 mg	8 Wochen	+	+
2	280 mg	8 Wochen	+	+
Hunger a	280 mg	8 Wochen	+	+
3	385 mg	11 Wochen	+	+
4	385 mg	11 Wochen	+	+
Hunger b	385 mg	11 Wochen	+	+
5	525 mg	15 Wochen	+	+
6	525 mg	15 Wochen	+	+
Hunger c	525 mg	15 Wochen	+	+

Histochemisches Verhalten von 11 und 15 Wochen Zeitwerten:
Glycogen: (PAS) Eine gewisse Erhöhung von Glycogen in den Insel-Bereichen. Bei den Tieren die 12 Stunden vor ihrem Tod gehungert hatten, kommt Glycogen nur dort vor, wo der inselartige Ausfall auftritt. Die "Strassen" Bereiche enthalten kein Glycogen.

ATPase (pH 7,2): Inselartige Ausfälle, nicht immer mit den von Gl-6-Phosphatase übereinstimmend.

Saure Phosphatase: Zeigt ein normales Bild, gelegentlich inselartige Aktivitätsverminderung mit der der Gl-6-Phosphatase unkorrelierbar.

Lebergewebe spezifisches Antigen : Gelegentlich Ausfälle (Inselartig) meist übereinstimmend mit derjenigen von Gl-6-Phosphatase.

Alkalische Phosphatase: Ein völlig normales Bild.

Hämalaun: Normales Bild.

(5) Rattenstamm: Sprague-Dawley ♂♂

Dosis: 10 Wochen 8 mg/Kg/Tier/Tag und weitere 10 Wochen je 4 mg/Kg/Tier/Tag. DAENA

Gesamtfütterungsdauer: 20 Wochen.

Tiergewicht: ca. 250-300 gr.

Die Lebern von den drei getöteten Tieren waren völlig vernarbt und geschädigt, so dass man keine klare Übersicht gewinnen konnte. Der untersuchte Tumor enthielt keine Gl-6-Phosphatase.

(6) Thioacetamid (TAA)

Rattenstamm: Sprague-Dawley ♀♀

Dosis: 8 mg/Kg/Tier/Tag (mit der Sonde) TAA

Tiergewicht: ca. 200 gr.

Je 2 Tiere nach 2 Wochen, 4 Wochen, 6 Wochen, 8 Wochen, 10 Wochen (ab Fütterungsbeginn). Schon 2 Wochen ab Fütterungsanfang (Ges. Dosis 22,4 mg) ist der Gl-6-Phosphatase Gehalt in einer schmalen zentralen Zone herabgesetzt, bzw. verschwunden (in allen Leberläppchen). Nach 4 wöchiger Fütterung (Ges. Dosis 44,8 mg TAA) ist die Anwesenheit von "Strassen" gesichert (Abb. 2 A u. B). Nach 6, 8 und 10 Wochen TAA Zufuhr zeigen die Untersuchungen des Lebergewebes übereinstimmende Befunde d.h. um die Zentralvenen angeordnete Verluste der Gl-6-Phosphatase Aktivität; im Bereich des Enzymverlustes fehlt auch das Glycogen. Zu keiner Zeit konnten "Inseln" gefunden werden.

(7) Stopp Versuche

Rattenstamm: Wistar (3♀ und 3♂)

Dosis: DAENA 8 mg/Kg/Tier/Tag (im Trinkwasser).

Gesamtdosis: 448 mg/Kg/Tier.

Fütterungsdauer: 8 Wochen.

Stoppdauer: 13 Wochen.

Tiergewicht: : ca. 250 gr. : zwei 250 gr., eins 350 gr.

♀♀

Tier Nr. 1: Gl-6-Phosphatase: Allerlei Veränderungen; Ausfall (Insel) Verminderung (auch inselartig) und sogar Erhöhung der Enzymaktivität (ebenfalls "inselartig"). Keine "Strassen".

Tier Nr. 2: Das gleiche histochemische Verhalten wie Tier Nr. 1.

Hungertier: Ein pfirsichkerngrosser Tumor am grossen Lappen; Gl-6-Phosphatase: (Lappen) Verminderung und Verlust "inselartig".

Allgemeines histochemisches Verhalten:

Glycogen: An "Inselbereiche" verstärkt, ausgenommen diejenigen, die eine erhöhte Gl-6-Phosphatase Aktivität aufweisen; in diesem Bereich wurde ein völliger Glycogenschwund festgestellt.

Saure Phosphatase: Zeigt Unregelmässigkeiten an der Enzymverteilung im Zellplasma, aber keinen Verlust.

Tumor-Verhalten (Hungertier):

Gl-6-Phosphatase: Teilweise frei, teilweise mit verminderter Aktivität.

Glycogen: Arm.

Saure Phosphatase: Reichlich vorhanden, aber "mosaikartig" verteilt. Es gibt zwischendurch Zellen, die überhaupt enzymfrei sind.

♂♂

Tier Nr. 1: Gl-6-Phosphatase: Keine Normabweichung (350 gr).
Keine "Strassen".

Tier Nr. 2: Gl-6-Phosphatase: Wenige Enzymfreie "Inseln",
sonst normal.

Hungertier: Gl-6-Phosphatase: Enzymfreie "Inseln".

Allgemeines histochemisches Verhalten:

Glycogen: An den inselentsprechenden Bereichen stärker angehäuft.

Saure Phosphatase: Es kommt eine bereichsweise Änderung an der intrazellulären Enzymverteilung vor, aber keine Verminderung.

(8) Rattenstamm: Sprague-Dawley ♂♂

Dosis: DAENA 5 mg/Kg/Tier/Tag (im Trinkwasser).

Gesamtdosis: 525 mg/Kg/Tier.

Fütterungsdauer: 15 Wochen.

Stoppdauer: s. unten.

Tiergewicht: ca. 200 gr.

2-3 Tiere wurden in Abständen von 2 Wochen, 3 Wochen, 5 Wochen und 9 Wochen, nach dem Stoppen von Cancerogenzufuhr, getötet.

Alle Zeitwerte zeigten homologes Verhalten:

Gl-6-Phosphatase: Inselartige Enzymausfälle, Verminderungen und manchmal Bereiche mit erhöhter Aktivität.

PAS (Glycogen): Ansammlung an den Gl-6-Phosphatase freie und verminderte Bereiche; völlige Abwesenheit in den Bereichen, die eine Erhöhung der Gl-6-Phosphatase Aktivität aufweisen.

ATPase (pH 7,2): Inselartige Ausfallbereiche, nicht immer mit den von Gl-6-Phosphatase übereinstimmend.

Saure Phosphatase: Gelegentlich Ausfälle nicht direkt vergleichbar mit den von Gl-6-Phosphatase.

Ein Tier von den 5 Wochen nach dem Stoppen (147 Tage ab Behandlungsanfang) sowie ein von den 9 Wochen nach dem Stopp (175 Tage ab Behandlungsbeginn) hatten erbsengrosse Tumoren.

- (9) Rattenstamm: Sprague-Dawley ♀♀
 Dosis: 8 mg/Kg/Tier/Tag (mit der Sonde).
 Gesamtdosis: 12 mg DAENA/Tier.
 Fütterungsdauer: 1 Woche.
 Versuchsdauer ab Fütterungsbeginn: 84, 168 und 210 Tage.
 Tiergewicht: 200 gr.

Pro Zeitwert wurden je 2 Tiere getötet. Jedesmal wurden von 4 verschiedenen Leberlappen je 20 Schnitte untersucht. Der Ausgangspunkt an den Messungen (1 Woche bei Dauerfütterung) waren "Strassen". Am zweiten Zeitwert (84 Tage) wurden kleinere Bereiche, die keine Gl-6-Phosphatase enthielten, sowie solche, die eine verminderte Enzymaktivität aufwiesen, festgestellt. Am dritten Zeitwert (168 Tage) wurde, ausser den kleineren Bereichen bei einem der beiden Tiere ein "Mikrocarcinom" festgestellt. Beim letzten Zeitwert wurden verhältnismässig (d.h. in Vergleich zu den früheren Werten) grössere Bereiche, die einen Verlust bzw. Verminderung aufweisen, festgestellt. Ausserdem kommen kleinere Bereiche vor, die eine Verstärkung an Enzymgehalt bzw. Aktivität zeigen.

Tabelle 5

Tier Nr.	8 Tage	84 Tage	168 Tage	210 Tage
1	"Strassen"	eine kl. Insel	"Mikrocarcinom"	kl. "Inseln"
2	"Strassen"	keine Veränderung	kl. "Insel"	kl. u. grössere "Insel", u. verfettete Bereich.

- (10) Rattenstamm: Sprague-Dawley ♀ ♀
Dosis: 8 mg/Kg/Tier/Tag (mit der Sonde). DAENA
Gesamtdosis: 448 mg/Kg/Tier.
Fütterungsdauer: 56 Tage.
Stoppdauer: s. unten.
Tiergewicht: 200 gr.

In Abständen von 3, 4, 5, 8, 9 und 12 Wochen ab letzter Cancerogen-Zufuhr wurden je 3 Tiere getötet; pro Zeitwert wurde einem der Tiere 12 Stunden vor der Tötung die Nahrung entzogen.

Allgemeines histochemisches Verhalten:

Gl-6-Phosphatase: Inselartige Bereiche, die mit verminderter, erhöhter oder verlorener Enzymaktivität erscheinen.

Glycogen (PAS): Mosaikartig verteilt; -inselartige Ansammlung sowie Ausfälle, vorwiegend in den Bereichen, in welchen eine Gl-6-Phosphatase erhöhte Aktivität auftritt.

ATPase (pH 7,2): Inselartige Ausfälle ausgedehnter als die von Gl-6-Phosphatase und nicht immer mit ihnen übereinstimmend.

Saure Phosphatase: Übersichtlich normales Bild; gelegentlich kleinere Bereiche welche eine Verminderung der Aktivität aufweisen, sowie solche, die mit verstärkter Aktivität erscheinen. Einige enzymfreie Zellen kommen einzeln vor.

Alkalische Phosphatase: Keine auffallende Normabweichung.

Zusätzlich ab fünften Zeitwert (112 Tage ab Behandlungsanfang) treten stellenweise blasige Schwellungen in Cytoplasma auf; auch eine Vermehrung der Basophile tritt deutlich hervor. Ab sechsten Zeitwert (119 Tage ab Behandlungsanfang) ist die Anwesenheit von Mikrocarcinomen sicher.

G1-6-Phosphatase Normabweichungen bei den Stopp-Versuchen
(Serie 10) in Prozent umgerechnet.

Pro Zeitwert wurden 30 "Inseln" (10 pro Tier) gezählt; die Summe wurde in Prozent umgerechnet.

Tabelle 6

Zeit (Tage)						(**)
Ab Behdl. Anfang	Stopp- dauer	S	Gr	W	M	
77	21	33	20	27	20	
84	28	33	27	17	23	
91	35	30	33	14	23	
105	49	30	30	17	23	
112	56	33	30	17	20	
119	63	33	30	20	17	
140	84	23	27	23	27	

(**) S = Umschriebene Bereiche, welche eine erhöhte Aktivität aufweisen.

Gr = Umschriebene Bereiche, welche eine verminderte Enzymaktivität aufweisen.

W = Umschriebene Bereiche, welche ihre Enzymaktivität verloren haben.

M = Umschriebene Bereiche, welche ihre Enzymaktivität nur teilweise verloren haben (der Verlust ist im ganzen "Inselbereich" unregelmässig verteilt).

Messungsbeispiel von "Inseln"-Fläche in Verhältnis zu den
unausdifferenzierten Bereiche

Zu diesem Zweck wurde eine Vergrößerung 6,3 x 12,5 benutzt; als Masstab wurde eine Einlage im Okular verwendet, welche eine Einteilung in 100 (10x10) Quadrate enthielt; somit war es möglich die gemessene Fläche gleichzeitig in Prozent auszurechnen. An den Grenzstellen wurde nach dem Blutzellen-Messprinzip gezählt; d.h. wenn die Fläche eines Quadrates von "Insel" diagonal besetzt war, dann wurde nur die untere Hälfte dazugezählt, und zwar als ganzes. Wenn die obere Quadrathälfte von einer "Insel" besetzt war, wurde sie dafür gar nicht berücksichtigt. Wenn ein Quadrat quer besetzt war, wurde nur dann gezählt, wenn weit über die Hälfte besetzt war. Pro Zeitwert wurden je Tier 10 "Inseln" gezählt (insgesamt 30).

Histochemische Untersuchungen der Tumoren

Obduktionsbefund zu Tab. 7

(Fortsetzung der Serie (8))

Rattenstamm: Wistar ♂♂

Dosis: 5 mg/Kg/Tier/Tag DAENA

Gesamtdosis: 525 mg/Kg/Tier

Fütterungsdauer: 15 Wochen

Stoppdauer: 16 Wochen

Tiergewicht: 200 gr.

Tier Nr.

- 1: Grosse nekrotische Tumoren; Metastasen im Omentum.
- 2: Leber makroskopisch normal; jedoch zahlreiche stechnadelkopfgrosse Tumoren, scharf begrenzt.
- 3: Erbsengrosser Tumor, sonst Leber makroskopisch normal.
- 4: Grosse Tumoren über die ganze Leber.
- 5: Leber völlig tumorös.
- 6: Wie 4, aber Tumoren teils nekrotisch.
- 7: Wie 5; Tumor-ähnliche Veränderungen in der Lunge.
- 8: Wie 4; Lunge wie 7.
- 9: Ein erbsengrosser Tumor am kleinen Lappen.
- 10: Mehrere kirschgrosse Tumoren, über die Leber verteilt.
- 11: Ein sehr grosser Tumor; Verwachsungen mit Niere, Diaphragma und Milz. Metastasen im Omentum.
- 12: Mehrere erbsengrosse Tumoren.
- 13: Sehr grosse Tumoren; Verwachsungen der Leber mit dem Nachbargewebe.

Erklärung zu den Tabellen 7 - 9:

- (M) = Mosaikartig verteilt
- ++ = Gleiche Enzymaktivität wie bei der unbehandelten Kontrolle
- + = Weniger als die unbehandelte Kontrolle
- +++ = Mehr Enzym als die unbehandelte Kontrolle
- = Keine Enzymaktivität

Die alkalische Phosphatase ist in normalen Leberparenchymzellen nicht enthalten.

Tabelle 7

Tier Nr.	Gl-6-Phosphatase	Glycogen (PAS)	ATPase	saure Phosphatase	alkalische Phosphatase
1 Tumor A	+	+	-	++	wenig
B	+	-	+	+	viel
C	++	-	+	++	viel
2	-	+	-	+	nichts
3	-	++	-	++	wenig
4 Tumor A	-	++ [*]	+	++	nichts
B	-	-	+	++	viel
5 Tumor A	++	+	-	+	wenig
B	+	+	-	++	viel
6 Tumor A	++	+	+	+	wenig
B	-	+	+	+	wenig
C	+	+	+	++	wenig
7	+	+	+	+	wenig

^{*}) d.h. die Hälfte der Fläche ++, die andere Hälfte enthält kein Glycogen.

Tabelle 7 Forts.

Tier Nr.	Gl-6-Phosphatase	Glycogen (PAS)	ATPase	saure Phosphatase	alkalische Phosphatase
8 Tumor A	+	(M)	+	++	nichts
B	-	(M)	+	++	nichts
C	-	+	+	+	wenig
D	+	++	+	+	wenig
E	+	+	+	+	wenig
9 Keine Tumoren					
10	+++	-	-	++ (M)	nichts
11	-	-	-	+	nichts
12	-	+++	-	+++	nichts
13	+	+	0 *)	+	wenig

*) keine Auswertung

Obduktionsbefund zu Tab. 8

(Fortsetzung der Serie (10))

Stamm: Sprague-Dawley ♀ ♀

Dosis: 8 mg/Kg/Tier/Tag DAENA

Gesamtdosis: 448 mg/Kg/Tier

Fütterungsdauer: 56 Tage

Stoppdauer: 6 Monate

Tiergewicht: 200 gr.

Tier Nr.

- 1: Kleine über die ganze Leber verteilte Tumoren
- 2: Zahlreiche Tumoren von verschiedener Grösse
- 3: Wie 1
- 4: Wie 1, 3
- 5: Wie 1, 3 und 4
- 6: Zahlreiche Tumoren von verschiedener Grösse
- 7: Zahlreiche Tumoren; zum Teil nekrotisch
- 8: Wie 7
- 9: Wie 1
- 10: Wie 1, 3, 4, 5
- 11: Wie 1, 3, 4, 5, 10
- 12: Wie 1, 3, 4, 5, 10, 11
- 13: Eine geringe Anzahl von kleinen Tumoren
- 14: Makroskopisch so gut wie normal
- 15: Ein pfirsichkerngrosser Tumor; daneben zahlreiche kleinere Tumoren
- 16: Wie 14
- 17: Wie 14 und 16
- 18: Ein kirschgrosser Tumor; viele kleinere Tumoren.

Tabelle 8

Tier Nr.	mikrosom. Antigen	Gl-6-Ph/ase	Glycogen (PAS)	ATPase	saure Ph/ase	alkalische Ph/ase	Fett)
1	+	+	++	-	++	nichts	-
2 Tumor A	++	+	-	+	+++	wenig	-
T B	+	-	+++	-	+	wenig	-
3	+	+	+	0 *)	+	wenig	-
4	+	+++	-	-	+++	nichts	*)
5	-	-	+	-	++	nichts	+
6 Tumor A	-	-	+	+	+	wenig	+
B	+	+	-	+	+	wenig	++
C	+	-	+	+	+	wenig	+
D	+	+	+	+	++	wenig	+
7 Tumor A	-	-	+	-	+	wenig	++
B	-	+	+	+++	++	nichts	++
C	+	+	+	-	+	nichts	++
		(M)					

*) Kontrolle fettfrei

***)) nicht in der ganzen Fläche

*) keine Auswertung

Tabelle 8

Tier Nr.	mikrosom. Antigen	Gl-6-Ph/ase	Glycogen (PAS)	ATPase	saure Ph/ase	alkalische Ph/ase	Fett
8 Tumor A	-	+	+	-	+	nichts	+
B	-	+	+	+	+	nichts	+++
9 Tumor A	-	+	+	-	++	wenig	+++
B	-	+	+	-	+	nichts	+
C	-	-	+	-	+	nichts	-
10 Tumor A	-	-	++	-	++	viel	++
B	-	-	++	-	+	wenig	-
11	-	-	++	-	++	wenig	++
12	-	-	++	-	++	wenig	++
13	+	+	+	+	++	nichts	+
14 keine Tumoren							
15	-	+	++	+	+++	wenig	+
16 17 keine Tumoren							
18 Tumor A	-	+	+	+	+	nichts	-
B	-	+	+	+	++	viel	++

(M) = mosaikartig verteilt

Behandlung der in Tab. 9 aufgeführten Versuchstiere

Rattenstamm: Druckrey

Dosis: ca. 5 mg/Kg/Tier/Tag Nitrosomorpholin

Gesamtdosis: 735 mg/Kg/Tier

Fütterungsdauer: 21 Wochen

Stoppdauer: 6 Monate

Tiergewicht: 200 gr.

Tabelle 9

Tier Nr.	Gl-6-Phosphatase	Glycogen (PAS)	ATPase	saure Phosphatase	alkalische Phosphatase
1	-	-	+++	+++	sehr viel
2 Tumor A	-	-	+	+	viel
Tumor B	-	+	+	+	wenig
3	-	-	+	++	viel
4	-	-	+++	++	wenig
5 Tumor A	-	-	++	++	viel
Tumor B	-	+++	+	++	viel
6	-	-	+++	+	viel
7	-	-	+++	++	nichts
8	+++	-	+++	+++	wenig

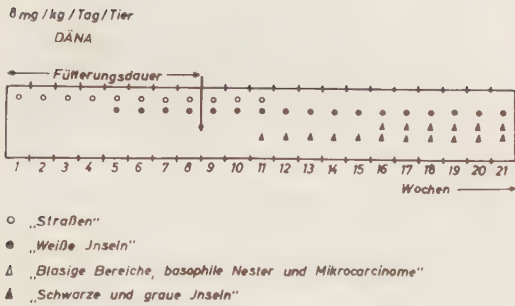


Fig. 1 Übersicht über die histochemischen Veränderungen nach 8 Wochen langer Applikation von DAENA bis zum Auftreten der ersten Carcinome.

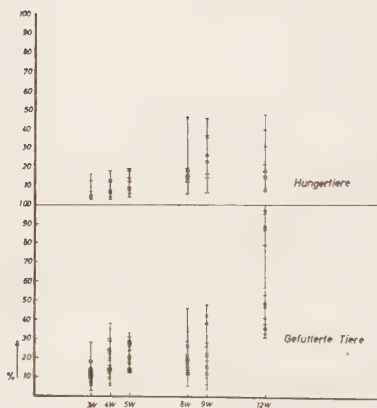


Fig. 2 Prozentualer Anteil von Inselgewebe in Stichproben im Vergleich zum gesamten Lebergewebe, nach 8wöchiger Behandlung mit DAENA
Abz. Zeit in Wochen gerechnet nach Abzug der Behandlungszeit.

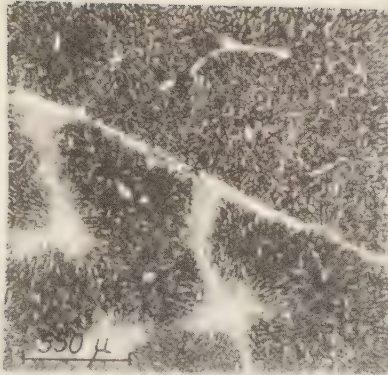


Abb. 1 Nachweis der Gl-6-Phosphatase. Kombinationspräparat.
Oben: Unbehandelte Kontrolle
Unten: Mit Thioacetamidbehandlung nach 56 Tagen
(8 mg/Kg/Tag)

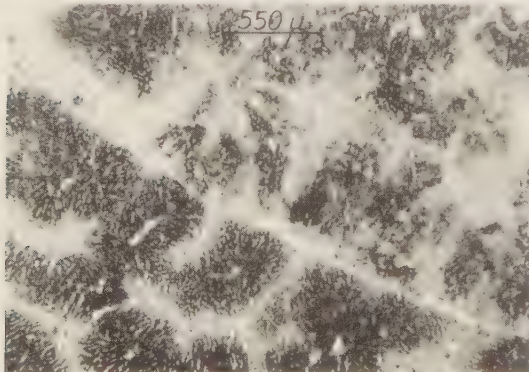


Abb. 2 Nachweis der Gl-6-Phosphatase. Kombinationspräparat.
Oben: Mit DAENA Behandlung.
Unten: Mit TAA Behandlung. Beide nach 56 Tagen
(8 mg/Kg/Tag)

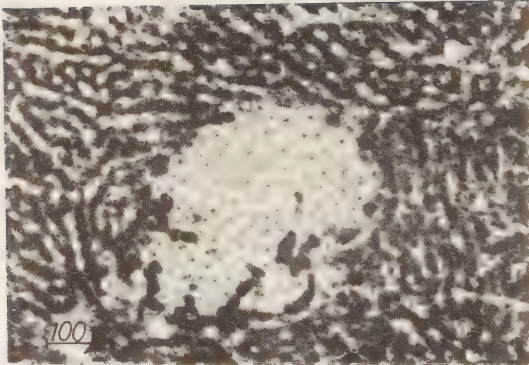


Abb. 3 Gl-6-Phosphatase Nachweis.

"Insel" mit Verlust der Enzymaktivität.

15 Wochen DAENA Behandlung (5 mg/Kg/Tag)

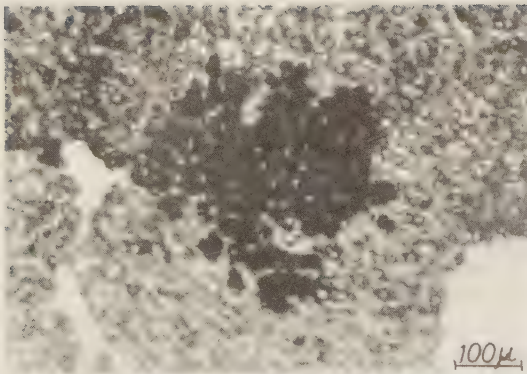


Abb. 4 Nachweis der Gl-6-Phosphatase.

"Insel" mit erhöhter Enzymaktivität. 9 mg/Kg/Tag DAENA
Behandlungsdauer: 8 Wochen. Stoppdauer: 13 Wochen.

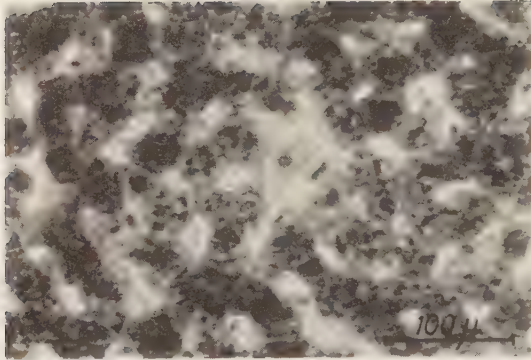


Abb. 5 Nachweis der Gl-6-Phosphatase.

Eine einzige Zelle welche Gl-6-Phosphatase Verlust aufweist. Gesamt Dosis: 12 mg DAENA, eine Woche. Stoppdauer: 84 Tage.

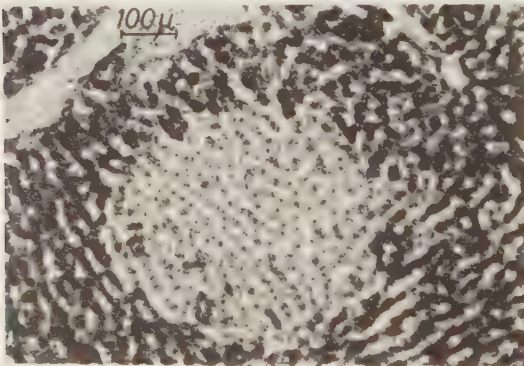


Abb. 6 Nachweis der Gl-6-Phosphatase.

Grössere "Insel" mit Enzymverlust. Behandlung: wie Abb. 5. Stoppdauer: 210 Tage.

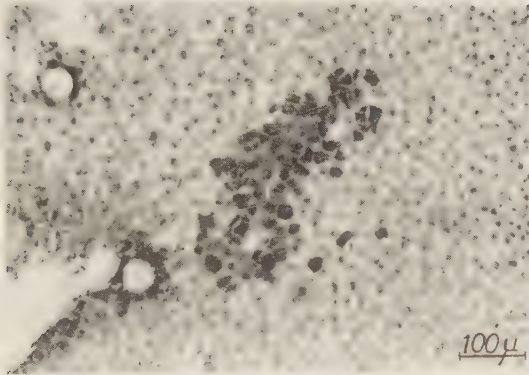


Abb. 7 Glycogen Nachweis (PAS): An der Stelle welche den Gl-6-Phosphatase freien Bereichen entspricht kann das Glycogen nicht mobilisiert werden "Hungertier".

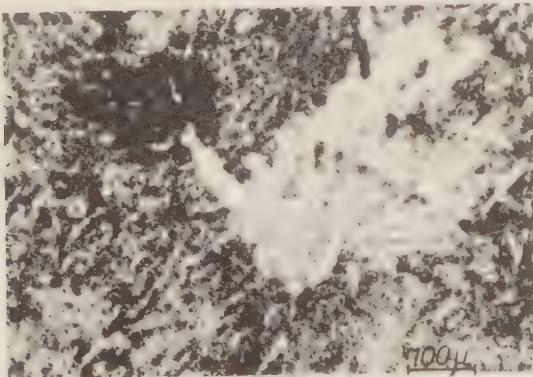


Abb. 8 Gl-6-Phosphatase Nachweis: "Inseln" rechts Enzymfrei links, mit erhöhter Enzymaktivität. 5 mg/Kg/Tag DAENA 112 Tage. Stoppdauer: 105 Tage.

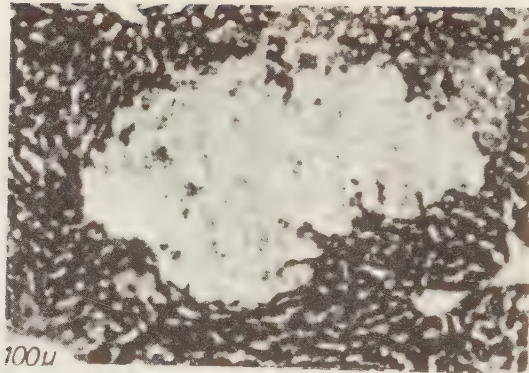


Abb. 9 Gl-6-Phosphatase Nachweis: Mikrocarcinom "Hungertier"
8 mg/Kg/Tag DAENA 8 Wochen. Stoppdauer: 8 Wochen.

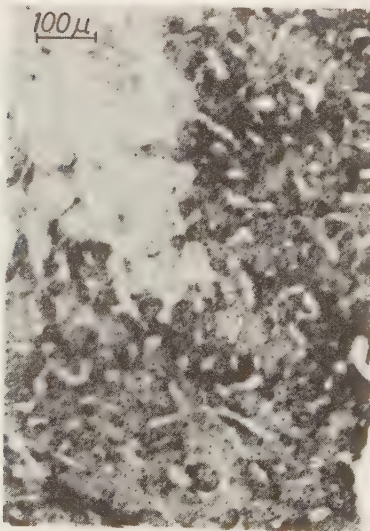
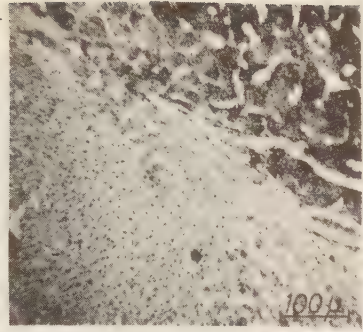
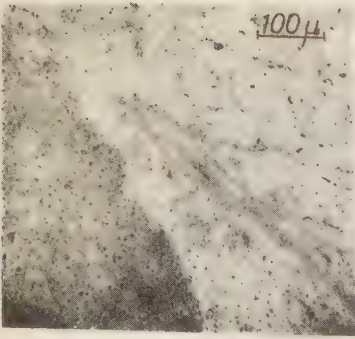


Abb. 10 Gl-6-Phosphatase Nachweis: Tumorauschnitt zum Teil
Gl-6-Phosphatase haltig. 5 mg/Kg/Tag DAENA 15 Wochen.
Stoppdauer: 16 Wochen.



Tumor A Tumor B
Abb. 11: Gewebe spez. Antigen
Nachweis: Kombinations
Präparat.

Tumor A Tumor B
Abb. 12: Gl-6-Phosphatase Nachweis
Kombinations Präparat

Abb. 11 und 12 sind das gleiche Objekt. Die Tumoren wurden vom gleichen Tier herauspräpariert. 5 mg/Kg/Tag DAENA 15 Wochen. Stoppdauer: 16 Wochen.

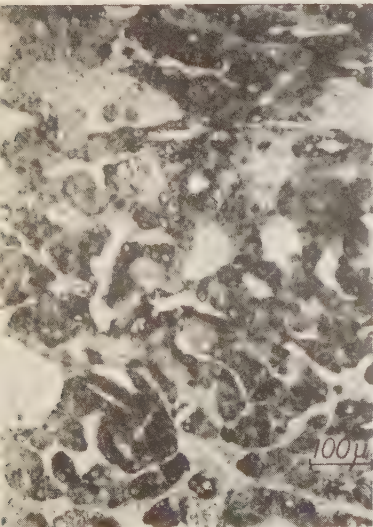


Abb. 13: Gl-6-Phosphatase
Nachweis: Tumor. 5 mg/Kg/Tag
DAENA 8 Wochen. Stoppdauer:
5 Monate.

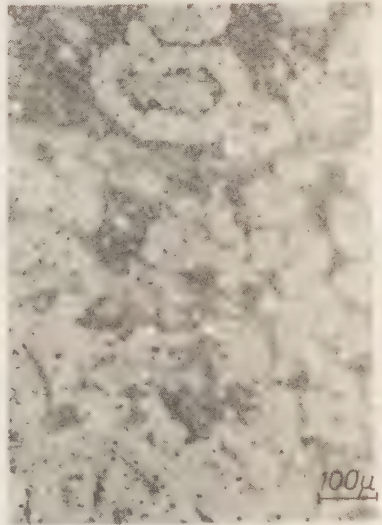


Abb. 14: Gewebe spez. Antigen
Nachweis: Der gleiche Tumor
wie Abb. 13.

Abb. 15, 16 und 17: Gl-6-Phosphatase Nachweis: Tumoren
von einem Tier. 5 mg/Kg/Tag DAENA 15 Wochen.
Stoppdauer: 16 Wochen.

Abb. 15 Gl-6-Phosphatase teilweise haltiger Tumor.

Abb. 16 Tumor mit vollständigem Enzymverlust.

Abb. 17 Tumor mit "mosaikartigen Verlust der Gl-6-
Phosphatase.

Unten: Fettige Degeneration.

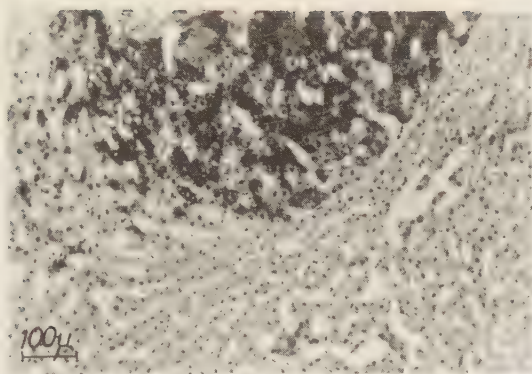


Abb. 15

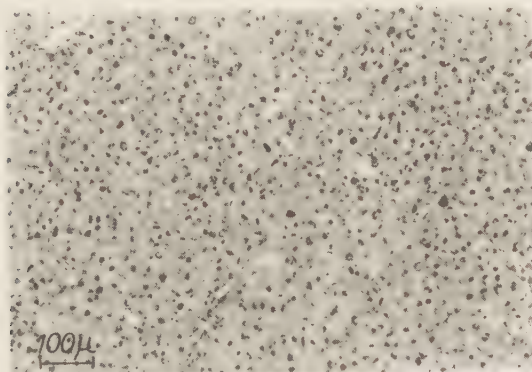


Abb. 16

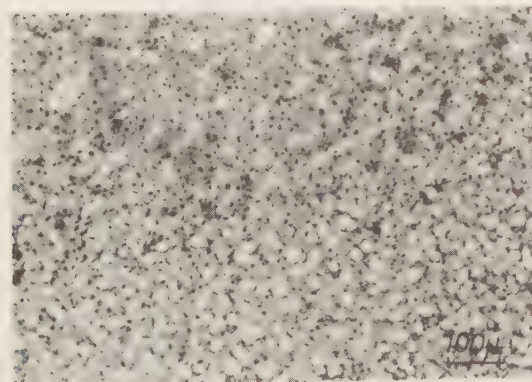


Abb. 17

Abb. 18, 19 und 20: Gl-6-Phosphatase Nachweis: Tumoren von
3 verschiedenen Tieren. 8 mg/Kg/Tag DAENA 8 Wochen.
Stoppdauer: 6 Monate.

Abb. 18: Tumor mit verstärkten Gl-6-Phosphatase Reaktion.

Abb. 19: Tumor mit Mosaik von Gl-6-Phosphatase haltigen
und freien Zellen.

Abb. 20: Tumor Gl-6-Phosphatase frei.

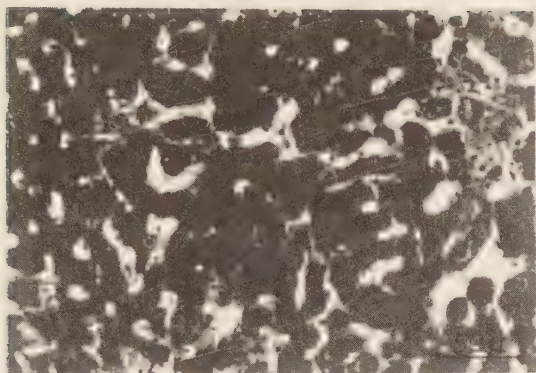


Abb. 18

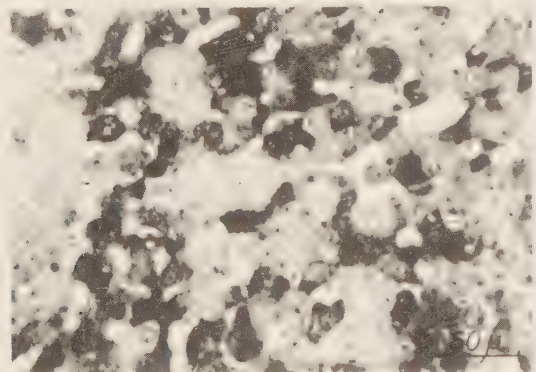


Abb. 19

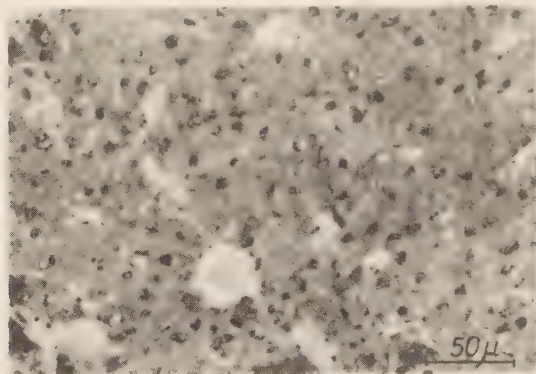


Abb. 20

Literatur

- (1) Yoshida, T. Trans. jap. path. soc. 22, 934 (1932)
24, 523 (1934)
Kinosita, R. Trans. soc. path. jap. 27, 665 (1937)
Bauer, K.H. "Das Krebsproblem" Springer verlag
346-353 (1963)
- (2) Magee, P.N. and Barnes, J.M. Brit. J. Cancer 10 114
(1956)
Argus, M and Hoch-Ligeti, C J Nat. Cancer Inst.
30 533-551 (1963)
Rapp, H.J., Carleton, J. and an. J. Nat. Cancer Inst.
34 453-458 (1965)
- (3) Druckrey, H. und a. Naturwissenschaften 48, 134 (1961)
- (4) Weber, G and Candero, A. Cancer Res. 15 105 (1955)
- (5) Friedrich-Frekxa, Süß and Börner Cellular control mech.
and cancer. 272-277 (1964)
- (6) Wachstein and Meisel, E J. Histol. and cytochem.
(Baltimore) 4, 592 (1956)
- (7) Roulet "Pathologische Histologie" Springer Verlag
Wien (1948)
- (8) Rouiller, A.M. "The Liver" Academic Press, London
164, (1963)
- (9) Coons, A. Kaplan, M. J. exp. medicin, 91 1 (1950)
- (10) Riggs, J.L. and a. Amer. J. path. 34 1-81- (1958)
- (11) - Bioch. bioph. acta 14, 380-389 (1954)
- (12) Nordlie, R.C. and W.J. Arion The J of biochemical
chemistry 293, 1680-1685 (1964)
- (13) Gössner, W. und Friedrich-Frekxa, H. Z. Naturforschung
19b 862-863 (1964)

- (14) Miller, E.C. and Miller, J.A. Cancer Res. 7, 468-480
(1947)
- Miller, J.A. and Miller, E.C. Cancer Res. 7, 39-41 (1947)
- (15) Potter, V.R Cancer Res. 21 1331-1333 (1961)
- Prog. exp. Tumor. Res. V3 370-411 (1963)
- (16) Klein, G. Cellular control mech. and cancer 236-241
(1964)
- (17) Pitot, H. Cancer Res. 20 1262-1268 (1960)
- (18) Schmähl, D. Preussmann, R. und Hamperl, H. Naturwissenschaften 47 89- (1960)
- (19) Thomas, C. Z. Krebsforschung 64 224 (1961)
- (20) Rappaport, A.*M. in "The Liver" Academic Press, London
295 (1963)
- (21) Gustafson, R and Afzelius, B.J. Nat. Cancer Inst.
30 1045- 1075 (1963)
- (22) Druckrey, H. Naturwissenschaften 49 ,217 (1962)
- (23) Weiler, E. Z. Naturforschung 11b ,31 (1956)
- (24) "Handbuch der Histochemie" Gustav Fischer Verlag
Stuttgart V. VII/1 (1960)

Lebenslauf

25. 12. 1936	In Athen/Griech. geboren
1942 - 1948	Besuch der Volksschule in Aighion/Griech.
1948 - 1954	Besuch des Mädchengymnasiums in Aighion
1954	Reifeprüfung
1957	Anfang des Studiums in Tübingen
1962	Beginn der Doktorarbeit unter der Leitung von Herrn Prof. Hans Friedrich-Frekxa (Max-Planck-Institut für Virus-Forschung)
1965	Abschluss des experimentellen Teils der Doktorarbeit

Meine akademischen Lehrer waren:

L. Bauer, Brecht, Bader, Bünning, Feneis, Friedrich-Frekxa,
Gieseler, Grell, Gierer, Hellmann, Krüger, Knapp, Kaudewitz,
Lingens, Möhres, Mörike, Mägdefrau, Metzner, Weitzel.

